

細菌グルコシダーゼおよび植物グルコシルトランスフェラーゼの構造と機能に関する研究

著者	野口 秋雄
号	3407
発行年	2004
URL	http://hdl.handle.net/10097/8679

氏名	のぐち あき お
授与学位	野口 秋 雄
学位授与年月日	博士 (工学)
学位授与の根拠法規	平成 17 年 3 月 25 日
研究科, 専攻の名称	学位規則第 4 条第 1 項
学位論文題目	東北大学大学院工学研究科 (博士課程) 生物工学専攻
指導教員	細菌グルコシダーゼおよび植物グルコシルトランスフェラーゼ の構造と機能に関する研究
論文審査委員	東北大学教授 西野 徳三
	主査 東北大学教授 西野 徳三 東北大学教授 熊谷 泉
	東北大学教授 正田 晋一郎

論文内容要旨

【緒言】炭水化物, 糖および配糖体は生体内において様々な機能を担っている重要な化合物である. これらの化合物の合成や分解, 修飾に関わる酵素群は Carbohydrate-Active enZymes (CAZymes) と総称されており, グリコシドヒドロラーゼ (GH), グルコシルトランスフェラーゼ (GT), ポリサッカライドリアーゼ, カルボハイドレートエステラーゼ, カルボハイドレート結合モジュールの 5 つのスーパーファミリーに分類されている. GH は 2 糖以上の炭水化物類あるいは炭水化物類と非炭水化物類間のグリコシド結合を加水分解する酵素で, 反応条件によっては糖転移反応も触媒する. GH は CAZymes の中で最も研究が進んでおり, 遺伝子解析, 立体構造解析, 反応機構解析がなされている. また, GT は活性化された糖供与体の糖部分を特異的な受容体分子に転移する反応を触媒する. GT は CAZymes の中で GH に次いで研究が進んでおり, 遺伝子解析, 立体構造解析がなされているが, 反応機構解析はまだ未解明な部分がある. これらの 2 種類の CAZymes は特にその産業的利用価値が高く, 注目を集めている. そこで本研究では GH としては, 細菌 α -グルコシダーゼ (第 2 章) を実験対象とし, 基質鎖長特異性改変, 基質特異性改変, 温度依存性改変を試み, さらにその機構に関する知見を得ることを目的とした. また, GT としては, 植物グルコシルトランスフェラーゼ (第 3 章) を実験対象とし, ダイズ根 GT およびクコ果実 GT の精製, 遺伝子クローニング, 異種発現, キャラクターゼーションを行い, その生化学的ならびに分子生物学的な知見を得ることを目的とした.

【細菌 α -グルコシダーゼ】好熱性細菌 *Bacillus* sp. SAM1606 の α -グルコシダーゼは 1-*O* α -D-グルコシドに作用し, これを加水分解する酵素である. 本酵素は GH ファミリー 13 に分類されており, 主にイソマルトースなどの短鎖基質に作用し, α -グルコシダーゼとしては最も幅広い基質特異性を持つ. また, 本酵素は耐熱性酵素であり, 低温ではほとんど活性を示さない.

基質鎖長特異性改変 本酵素と同じ GH ファミリー 13 に分類されているデキストラングルコシダーゼは α -1,6 結合のグルコースオリゴマー (イソマルトオリゴ糖) やポリマ

ー (デキストランなど) に作用し、その非還元末端から加水分解する *exo* 型の酵素である。デキストラングルコシダーゼは本酵素と高いアミノ酸配列同一性 (約 50%) を示すが、本酵素と異なり長鎖基質に対し特異性が高い。本酵素やデキストラングルコシダーゼが含まれるサブグループ内の GH のアミノ酸配列を比較すると、N 末端ドメインの S β 1 と S β 2 を連結するループおよび(β/α)₈バレル構造内の loop 4 においてデキストラングルコシダーゼにのみ欠失配列が見られ、これらの配列の有無が基質鎖長特異性の違いに何らかの影響を与えていることが推測された。そこで本研究では、本サブグループ内の GH の基質鎖長特異性におけるこれらのループの重要性を明らかにするために、本酵素におけるこれらのループの一部を欠失させたいくつかの変異型酵素を作製し、基質鎖長特異性、速度論解析、熱力学的解析を行った。また、分子モデリングを用いて本酵素におけるこれらのループの重要性を立体構造上から議論した。その結果、(β/α)₈バレル構造内の loop 4 から余分な配列を欠失させることにより、長鎖基質に対する相対活性が増加した変異型酵素を得ることに成功した。この現象は以下にあげる 2 つの要因が考えられる。1 つは分子モデリングの結果から予想されるように長鎖基質が触媒部位に近づき易くなったということが挙げられる。もう 1 つは長鎖基質とのミカエリス複合体が不安定化し、それによって $\Delta(\Delta G^\ddagger)$ が減少したことが挙げられる。

基質特異性改変 本酵素は様々な α -グルコシド結合 (α -1,1-, α -1,3-, α -1,4-, α -1,6-結合) に作用し、これを加水分解する。特に、本酵素は α,α' -trehalose の α -1,1-結合を効果的に加水分解できる数少ない α -グルコシダーゼである。以前の研究において、本酵素の Gly²⁷³ を *Bacillus cereus* オリゴ-1,6-グルコシダーゼ (O16G) の対応する位置に存在するプロリンに置換した変異型酵素は野生型酵素に比べ isomaltose, maltose, sucrose に対する触媒効率に大きな差は見られなかったが、trehalose に対する親和性が大きく減少したという現象が観察された。これまでの研究においては本酵素の 273 位のアミノ酸残基による特異性変化の詳細な機構はまだ未解明であり、また 273 位のアミノ酸残基がグリシンでなければならないかどうかはまだ不明である。そこで本研究では、これらのことを解明するために本酵素の Gly²⁷³ を他のすべてのアミノ酸に置換し、得られたいくつかの変異型酵素の速度論解析を行った。さらに、分子モデリングにより構築した酵素-基質複合体の立体構造解析により本酵素の 273 位のアミノ酸残基の基質特異性における役割を考察した。その結果、273 位のアミノ酸残基を嵩高いアミノ酸 (イソロイシン、メチオニンなど) に置換することにより、trehalose や maltose に対する親和性が大きく減少した変異型酵素が得られた。一方で、273 位のアミノ酸残基を小さいアミノ酸 (バリン、セリンなど) に置換した変異型酵素は野生型酵素と基質特異性に大きな変化は見られなかった。また、立体構造上から本酵素の 273 位のアミノ酸残基はサブサイト +1 および +2 付近に存在しており、このアミノ酸残基の大きさ (嵩高さ) の違いにより基質結合性に変化が生じることが予想された。以上の結果や系統樹解析から本酵素は trehalose や maltose に対する活性を獲得した O16G の変種であることが示唆された。

温度依存性改変 本酵素は 70℃ 付近に反応至適温度を持ち、65℃ まで安定な耐熱性酵

素である。一般に、酵素が耐熱性であることは、熱のほか、タンパク質変性剤、界面活性剤、タンパク質分解酵素などに対しても安定であることを意味し、その産業的利用において非常に有利である。しかし、本酵素を含めた耐熱性酵素は、低温における低い酵素活性のためその産業的応用範囲が限定されているのが現状である。このような背景から、「耐熱性を保持し、かつ低温で活性を示す酵素」の創製が期待されている。一般に、酵素の基質特異性・反応特異性・pH 依存性は酵素の活性部位近傍アミノ酸残基の種類に大きく影響を受けることが知られているが、以前の研究において本酵素の活性部位近傍に存在する 272 位のアミノ酸残基をバリンまたはメチオニンに置換した変異型酵素が、野生型酵素と異なる反応温度依存性と低温での高い活性を示すことが見いだされた。このことから、活性部位近傍に存在する 272 位のアミノ酸残基が本酵素の温度依存性に重要であることが示唆された。そこで本研究では部位特異的変異を導入して 272 位を他のアミノ酸に置換した変異型酵素を作製し、その反応の温度依存性を速度論的に解析することにより、そのメカニズムについての理解を深めることを目的とした。その結果、本酵素の 272 位のアミノ酸残基を中型から大型または疎水性のアミノ酸で置換することにより、耐熱性を保持した低温で高活性な変異型酵素がいくつか得られた。これらの変異型酵素の低温での高い活性は k_{cat} の向上 (25℃において野生型酵素の 1.5-11 倍) によるものであり、熱力学的には ΔG_{\ddagger} の減少に起因するもので、 ΔG_{\ddagger} の減少は酵素-基質複合体の不安定化による ΔG_{\ddagger} の増加に原因があるものと考えられる。

これらの酵素機能の改変は GH の産業的応用範囲を広げる有効な手段となることが期待される。

【植物グルコシルトランスフェラーゼ】植物二次代謝産物に対する GT 群 (PSPG) はヌクレオシド二リン酸にて活性化されたグリコシル基を二次代謝産物、ホルモン、生体異物などの低分子基質に転移する反応を触媒する。グリコシル化はその分子を可溶化、安定化、無毒化したり、細胞内局在性や生理活性、腸管吸収性を変化させる効果がある。PSPG は位置選択性や触媒効率の高さから産業上重要な化合物を修飾するための有用なツールとして期待されている。

ダイズ根 GT イソフラボンはマメ科植物に特異的に蓄積される無色のフラボノイド化合物である。イソフラボンはマメ科植物にとって重要な役割を果たすだけでなく、エストロゲン様作用などの様々な抗疾患作用を示し、近年機能性食品として注目されている。マメ科ダイズ (*Glycine max*) の種子である大豆は古くから食品として親しまれてきたが、近年欧米等で高い栄養学的評価を受け、大きな注目を受けている。近年、イソフラボン代謝経路に関わる酵素群の研究が多くなされており、これらの酵素群の中でイソフラボン配糖体をマロニル化する酵素 (Gm7MaT) とイソフラボン配糖体からイソフラボンアグリコンを生成する酵素 (GmICHG) に関しては研究が進んでおり、ダイズにおいて酵素精製や遺伝子クローニング、異種発現、キャラクタリゼーションがなされている。しかし、イソフラボンアグリコンを配糖化する酵素 (GmIF7GT) に関しては 1981 年にマメ科ヒヨコマメにおいて酵素の部分精製がなされて以来、研究の報告はなされていない。そこで本研究では GmIF7GT に関する分子生物学的な知見を得ることを目的

とし、その酵素精製、遺伝子クローニング、異種発現、キャラクタリゼーションを行った。その結果、ダイズ根の粗酵素液中に見いだされる IF7GT 活性を追跡することで、GmIF7GT を精製した。本酵素は他の PSPG と同様に水溶性の単量体酵素で、イソフラボンに対して高い特異性を示した。さらに、PSPG 遺伝子 (*GmIF7GT* 遺伝子) を単離し、その大腸菌発現産物の速度論パラメータ、基質特異性、反応特性などはダイズ根より単離した IF7GT 活性のものと一致したことから、本研究において単離した *GmIF7GT* 遺伝子はダイズ根におけるイソフラボン代謝経路に関与する IF7GT 活性の本体であると考察した。

クコ果実 GT 上述したように PSPG は様々な産業的応用が期待され、自然界に存在するであろう新規な基質特異性をもつ PSPG 遺伝子を幅広く取得することはその応用範囲を広げる。しかしながら、植物組織から PSPG を単離してそのアミノ酸配列を解析することは容易ではなく、取得できる数に限界があるため有効な手段とは言えない。このようなことから、全く新規な PSPG 遺伝子の取得法として PSPG box 内の高度保存配列を利用した網羅的 PSPG 遺伝子クローニング法が注目されており、いくつかの PSPG 遺伝子の単離に成功している。薬用植物として知られているナス科クコ (*Lycium chinense*) の果実 (図 3.3-2) を乾燥させたものは枸杞子と呼ばれ、滋養強壮、老化予防、内臓の強化など様々な効能があり、中国において古くから生薬として使われてきた。クコ果実中にはいくつかの薬効成分が発見されており、その生理活性の報告もなされている。これらの薬効成分の中には配糖化されているものも発見されており、新規で有用な PSPG の存在が予想される。そこで本研究では植物材料としてクコ果実を用い、有用な PSPG 遺伝子を取得することを目的とし、網羅的 PSPG 遺伝子クローニングを行い、さらに得られた PSPG 遺伝子の異種発現および発現産物のキャラクタリゼーションを行った。その結果、クコ果実から 6 種の PSPG 遺伝子をクローニングした。それらのうち *LcGT8* 発現産物 (hLcGT8) は有意なフラボノイドグルコシルトランスフェラーゼ活性を示した。hLcGT8 は配糖化する水酸基の位置特異性は低い、フラボノイド化合物全般およびフェニルプロパノイド化合物、betanidin, capsaicin などの有用化合物に対し広い特異性を示した。

これらの PSPG 遺伝子およびその発現産物は植物機能改変や物質変換への応用が期待される。

論文審査結果の要旨

本学位論文は炭水化物類の合成や分解、修飾に関わる酵素群 (Carbohydrate-Active enZymes, CAZymes) の産業的利用を目的とし、特に産業的利用価値が高いグリコシドヒドロラーゼ (GH) およびグリコシルトランスフェラーゼ (GT) の構造と機能に関して研究したものである。GH としては、細菌 α -グルコシダーゼを実験対象とし、基質鎖長特異性改変、基質特異性改変、温度依存性改変を試み、さらにその機構に関して研究している。また、GT としては、植物グリコシルトランスフェラーゼを実験対象とし、ダイズ根 GT およびクコ果実 GT の精製、遺伝子クローニング、異種発現、キャラクタリゼーションを行い、その生化学的ならびに分子生物学的な知見をまとめたものであり、全 4 章で構成されている。

第 1 章は総論であり、本研究の背景および目的について述べている。

第 2 章は細菌 α -グルコシダーゼの構造と機能に関する研究について述べている。好熱性細菌 *Bacillus* sp. SAM1606 の α -グルコシダーゼは 1-*O*- α -D-グルコシドに作用し、これを加水分解する酵素である。本酵素は主にイソマルトースなどの短鎖基質に作用し、 α -グルコシダーゼとしては最も幅広い基質特異性を持つ。また、本酵素は耐熱性酵素であり、反応至適温度は 75℃ にあり、低温ではほとんど活性を示さない。長鎖基質にも作用するデキストラングルコシダーゼとの一次構造上の比較から、本酵素の基質鎖長特異性に重要であると思われるループを欠失することで長鎖基質に対する相対活性が増加した変異型酵素を得ることに成功し、その機構に関する知見を得た。また、基質特異性の狭い他の α -グルコシダーゼとの一次構造上の比較から、本酵素の基質特異性に重要であると思われる残基を置換することで基質特異性を狭めた変異型酵素を得ることに成功し、その立体構造的な解析を分子モデリングにより行った。さらに、本酵素のアミノ酸 1 残基を置換することで温度依存性が変化し、低温での比活性が増加した変異型酵素を見だし、その機構に関する知見を得た。

第 3 章は植物グリコシルトランスフェラーゼの一次構造と機能に関する研究について述べている。植物二次代謝産物に關与する GT 群 (PSPG) はヌクレオシドニリン酸にて活性化されたグリコシル基を二次代謝産物、ホルモン、生体異物などの低分子基質に転移する反応を触媒する。グリコシル化はその分子を可溶化、安定化、無毒化したり、細胞内局在性や生理活性、腸管吸収性を変化させる効果がある。このようなことから、PSPG は産業上重要な化合物を修飾するための有用なツールとして期待されている。近年機能性食品として注目されているイソフラボンに作用する GT (GmIF7GT) をダイズ根から精製し、遺伝子クローニング、異種発現、キャラクタリゼーションを行った。その結果、GmIF7GT はイソフラボンに対する特異性が高く、本酵素がダイズ根におけるイソフラボン生合成に關与するイソフラボン特異的な GT 活性の本体であることが示唆された。また、クコ果実の遺伝子ライブラリーから、PSPG 遺伝子の網羅的クローニングを行い、異種発現を試みた。その結果、6 つの PSPG 遺伝子を取得し、その中の 1 つの PSPG 遺伝子 (*LcGT8*) の異種発現、キャラクタリゼーションに成功した。*LcGT8* は広い基質特異性を示し、特にフラボノイド化合物に高い基質特異性を示した。

第 4 章は以上を総括している。

以上要するに本論文の成果として、細菌 α -グルコシダーゼについて異なる 3 種類の酵素機能改変に成功し、GH の産業的応用範囲を広げる有効な手段となることが期待された。また、PSPG の生化学的ならびに分子生物学的な知見を得ており、ここで得られた PSPG 遺伝子ならびにその発現産物は植物の機能改変や物質変換への酵素工学の発展に寄与することが少なくない。

よって、本論文は博士(工学)の学位論文として合格と認める。